



18 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 100 61 334 A 1**

51 Int. Cl. 7:  
**A 61 K 39/39**  
A 61 K 48/00

21 Aktenzeichen: 100 61 334.9  
22 Anmeldetag: 4. 12. 2000  
43 Offenlegungstag: 13. 6. 2002

DE 100 61 334 A 1

71 Anmelder:  
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,  
13125 Berlin, DE  
  
74 Vertreter:  
Baumbach, F., Dr.rer.nat. Pat.-Ing., Pat.-Ass., 13125  
Berlin

72 Erfinder:  
Bader, Michael, Dr., 13125 Berlin, DE; Binas, Bert,  
Dr., College Station, Tex., US; Chai, Giuxuan, Dr.,  
New Haven, Conn., US; Fändrich, Fred, Dr.med.,  
24105 Kiel, DE; Ganten, Detlev, Prof. Dr.med., 16341  
Schwanebeck, DE; Lin, Xiongbin, Dr.med., 24103  
Kiel, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verwendung von aus embryonalen Stammzellen hergeleiteten Zellen zur Erhöhung der Transplantationstoleranz und zur Wiederherstellung zerstörten Gewebes

57 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Zellen aus Zelllinien, die aus frühen Embryonalstadien abgeleitet werden, zur spenderspezifischen Erhöhung der Transplantationstoleranz und zur Wiederherstellung zerstörten Gewebes. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine spender-spezifische Immuntoleranz zu erzeugen, um eine Abstoßung des transplantierten Gewebes durch eine Immunreaktion zu verhindern und so die Verabreichung von Immunsuppressiva einschränken zu können. Für die Erzeugung einer spenderspezifischen Immuntoleranz werden embryonalen Stammzellen ähnliche Zelllinien (embryonic stem cell like cell lines, ECL) aus Blastozysten gewonnen und mit genetischem Material des Spenders, das für die MHC-Haplotypen kodiert, transfiziert. Die so erzeugten Zellen werden dem Empfänger schließlich vor der Transplantation zur Erzeugung der Immuntoleranz gegen das zu transplantierende Gewebe bzw. zur Erneuerung bereits geschädigten Gewebes verabreicht.

DE 100 61 334 A 1

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von Zellen aus Zelllinien, die aus frühen Embryonalstadien abgeleitet werden, zur spenderspezifischen Erhöhung der Transplantationstoleranz und zur Wiederherstellung zerstörten Gewebes.

[0002] Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

## Stand der Technik

[0003] In der Transplantationsmedizin hat die Entwicklung zunehmend starker Immunsuppressiva wie Prednison, Cyclosporin, Tacrolimus, Mycophenolatmefetil und Antilymphozyt-Antikörper die Überlebensdauer der Patienten und die Verweildauer der Transplantate um durchschnittlich ein Jahr erhöht. Die routinemäßige Anwendung dieser Medikamente hat die klinische Transplantation zu einer Standardbehandlung gemacht, die für die meisten nichtmalignen terminalen Erkrankungen des Herzens, der Nieren und der Leber gewählt wird.

[0004] Eine Verbesserung der frühen Überlebensdauer der Transplantate wurde jedoch nicht ohne eine beachtliche infektiöse Morbidität und nichtimmune Nebeneffekte (Gaber et al., Transplantation 66: 29-37, 1998) erreicht. Darüber hinaus konnte eine bessere frühe Überlebensdauer nicht in eine bessere langfristige Überlebensdauer des Transplantates überführt werden, da die chronische Abstoßung weiterhin die Transplantate nach dem ersten Jahr in einer Häufigkeit, die sich in den letzten 20 Jahren im wesentlichen nicht verändert hat (Cecka und Terasaki, Clinical Transplants 1997, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1998), funktionsunfähig gemacht hat. Außerdem zeigten sich bei längerem Verfolgen des klinischen Verlaufs von Transplantationen (Pirsch and Friedman, J. Gen. Intern. Med. 9: 29-37, 1994) zunehmend eine späte Morbidität und Mortalität aufgrund der weiteren Notwendigkeit einer nicht-spezifischen Immunsuppression.

[0005] Der Begriff der Immuntoleranz (nachfolgend als Toleranz bezeichnet), der allgemein mit dem Ausbleiben einer Immunreaktion nach Verabreichung oder Aufnahme eines bestimmten Antigens (AG) beschrieben werden kann, besitzt in der Transplantationsmedizin eine zentrale Rolle. Vom Standpunkt des Transplantationsimmunologen kann die Toleranz als anhaltende Persistenz eines Gewebes in Abwesenheit einer schädlichen Immunreaktion definiert werden, die ohne andauernden therapeutischen Eingriff erreicht werden kann. In diesem Zusammenhang ist es wichtig festzustellen, daß die Toleranz keine angeborene Eigenschaft eines Individuums ist, sondern erworben wird (Owen, Science 102: 400-401, 1945; Billingham et al., Nature 172: 603-606, 1953). Es ist weiterhin bekannt, daß sich der tolerante Zustand, der bei der Geburt besteht, ständig verändert und zwar vor allem dann, wenn der Körper im Laufe des Lebens mit neuen Antigenen konfrontiert wird. Das Immunsystem muß z. B. in der Lage sein, bestimmte "fremde" Antigene, wie während der Pubertät und Schwangerschaft freigesetzte physiologische Hormone, zu tolerieren (Powlkes and Ramsdell, Curr. Opin. Immunol. 5: 873-879, 1993). Auch die Tatsache, daß sich fötales Leben entwickeln und in einem an major histocompatibility complex (MHC) nichtangepaßten Wirt überleben kann, ist ein weiteres Beispiel für die Fähigkeit der Natur, nicht nur zwischen fremd und nicht fremd, sondern auch zwischen gefährlich und ungefährlich unterscheiden zu können (Vacchio and Jiang, Crit. Rev. Immunol. 19: 461-480, 1999).

[0006] Bei einer allogenen hämatopoetischen Stammzel-

lenttransplantation (CD34<sup>+</sup>) wird eine erfolgreiche Transplantation in an MHC nichtangepaßten Wirten nur dann erreicht, wenn der Empfänger sublethal myeloablatiert oder bestrahlt wird.

Nachteile der bisherigen Organ- bzw. Gewebetransplantationen

[0007] Um eine Abstoßung des Transplantats durch eine Immunreaktion zu verhindern, werden gegenwärtig starke Immunsuppressiva verabreicht, die jedoch wiederum eine gesteigerte Infektanfälligkeit hervorrufen. So können ubiquitäre Keime, die bei einem normal funktionierenden Immunsystem keinerlei Gefahr darstellen, in einem immunsuppressiven Zustand schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen. Bei einer Blutstammzellentransplantation (CD34<sup>+</sup>) wird zum Beispiel eine erfolgreiche Transplantation in einen an MHC nichtangepaßten Empfänger nur dann erreicht, wenn das Knochenmark des Empfängers vorher entfernt bzw. durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zerstört wurde.

## Aufgabenstellung

[0008] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine spenderspezifische Immuntoleranz zu erzeugen, um eine Abstoßung des transplantierten Gewebes durch eine Immunreaktion zu verhindern und so die Verabreichung von Immunsuppressiva einschränken zu können.

## Beschreibung der Erfindung

[0009] Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

[0010] Für die Erzeugung einer spenderspezifischen Immuntoleranz werden embryonalen Stammzellen ähnliche Zelllinien (embryonic stem cell like cell lines, ECL) aus Blastozysten gewonnen und mit genetischem Material des Spenders, das für die MHC-Haplotypen kodiert, transfiziert. Die so erzeugten Zellen werden dem Empfänger schließlich vor der Transplantation zur Erzeugung der Immuntoleranz gegen das zu transplantierende Gewebe bzw. zur Erneuerung bereits geschädigten Gewebes verabreicht.

[0011] Der Einsatz der Zellen aus den ECLs als "Toleranzvektoren" wird durch einen Mangel an MHC-Antigen-Expression und die damit verbundene immunogene Inaktivität der ECL eröffnet. Durch Untersuchungen wurde festgestellt, daß Zellen von ECLs transplantiert werden können und langfristig überleben, wobei sie hämatopoetische Zellen unterschiedlicher Abstammung erzeugen. Darüber hinaus haben diese aus ECL abgeleiteten hämatopoetischen Zellen einen ständigen gemischten Chimärismus erzeugt (hämatopoetische Zellen des Spenders und des Empfängers existieren nebeneinander im gleichen Wirt) und schaffen somit die Basis für eine langfristige Allo-Transplantataktzeptanz. Demzufolge können sie entweder als ideales Mittel für die Toleranzerzeugung eingesetzt werden oder alternativ in einer Situation Anwendung finden, in der die parenchymatöse Verletzung eines bestimmten Organs zu beheben ist.

[0012] Die Erfindung wird nachfolgend näher erläutert.  
[0013] Für die ECL-Isolation wurden drei Rattenrassen gewählt, Wistar Kyoto (WKY), Sprague Dawley (SD) und ACL.

[0014] Aus diesen gewonnenen Blastozysten wurden auf durch Mitomycin inaktivierte Embryofibroblasten von Mäusen (MEF) oder Ratten (REF) als Versorger gepflanzt. Die MEF erwiesen sich als besser und beide, MEF und REF, waren eindeutig Gelatine überlegen. Wenn sich Auswüchse der

inneren Zellmasse (ICM) nach dem Anwachsen der Blastozysten an die Versorgerschicht bildeten, konnten sie gewöhnlich leicht in Gruppen von ES-ähnlichen Zellklumpen (Primärklumpen) etwa 10 Tage lang erweitert werden (Primärwachstum). Danach differenzierten sich die Zellen weitgehend in ein Gemisch verschiedener Zelltypen und wurden bald von runden, locker angeordneten, endodermartigen Zellen überwachsen. Nur ein kleiner Teil der Zellen aus den Primärklumpen überlebte und wurde zu einer Zelllinie erweitert.

[0015] WKY-Blastozysten wuchsen sehr schnell an, zeigten ein starkes Primärwachstum und mehr als 10% der Embryos erzielten ständige Zelllinien (Tabelle 1). SD-Blastozysten wuchsen mit etwas Verzögerung an, erzielten eine moderate Anzahl von Primärklumpen und die Effektivität der Zelllinienherzeugung war gering. ACI-Blastozysten brauchten die längste Zeit für das Anwachsen, erzeugten eine sehr kleine Zahl von Primärklumpen und keine Zelllinie konnte von dieser Rasse erzeugt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Geschwindigkeit, mit der sich die Blastozysten an die Versorgerschicht binden, und die Anzahl der Primärklumpen während des größten Primärwachstums positiv mit der Effektivität der ECL-Ableitung verbunden (Tabelle 1) sind. Es ist interessant, daß bei den Hybridblastozysten der WKY-Genotyp die ACI bei der Herstellung der ECLs schlägt, jedoch nicht den SD-Genotyp (Tabelle 1).

[0016] Der Einsatz der Zellen aus den Zelllinien, die aus den embryonalen Stammzellen erzeugt wurden, als "Toleranzvektoren" zur Herbeiführung einer spenderspezifischen Immuntoleranz bedingt weiterhin die Expression der spenderspezifischen MHC-Antigene. Diese Eigenschaft wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß Zellen der ECLs mit den Genen des Spenders, die für die MHC-Antigene codieren, transfiziert werden. Dies kann durch (i) Fusion der ECL mit einer gegebenen somatischen Zelle oder Zelllinie erfolgen, die die MHC-Gene, die von Interesse sind, aufweist, durch (ii) Transfektion der ECL mit einem gegebenen MHC-kodierenden Plasmid, durch (iii) Schaffung transgener Ratten mit einem MHC-kodierenden Plasmid und die Erstellung von ECL von dieser Rasse oder durch (iv) Peptid-Beladung der ECL mit MHC-Allopeptiden der Klasse I, die für die hochpolymorphe  $\alpha_1$ -Helix eines spezifischen MHC-Antigens der Klasse I kodieren. Für die Verabreichung der transfizierten Zellen stehen verschiedene Varianten, z. B. über die Portalvene, durch intraperitoneale, subkutane oder intravenöse Injektion, zur Verfügung.

[0017] In der klinischen Praxis der Organtransplantation wird dadurch die Möglichkeit geschaffen, die Alloreaktion der Empfänger durch die Verabreichung von ECLs, die die spenderspezifischen MHC-Antigene exprimieren, zu modifizieren. Eine exakte Phänotypisierung und morphologische Charakterisierung der von ECL abgeleiteten Abkömmlinge ermöglicht, ähnliche Zellen mit Stammzellenmerkmalen im erwachsenen Wirt zu suchen. Dies ermöglicht, zu einem besseren Verständnis der Plastizität der aus einem erwachsenen Gewebe hergeleiteten Stammzellen zu kommen, die, alternativ zu den ECL, die ECL-Eigenschaften teilen und in ähnlicher Form verwendet werden können.

#### Ausführungsbeispiele

##### 1. Isolation und Kultivierung der Ratten-ECL

[0018] Mausembryofibroblasten (MEF) oder Rattenembryofibroblasten (REF) werden aus 13-14-Tage schwangeren Tieren bereitet, die mitotisch inaktiviert wurden durch 3-5 Behandlungen mit Mitomycin C (10 µg/ml) 2 oder 1 Stunden lang, gewaschen mit Phosphat gepufferter Salzlös-

sung (PBS) und in Nunc 4-Muldenschalen (well-dishes) gepflanzt. Die Blastozysten werden mit PBS/20% FCS (fetales Kälberserum) oder einem Kulturmedium aus dem Uterus von 4,5 Tage schwangeren Ratten gespült, auf inaktivierte Embryofibroblasten gepflanzt und 3-4 Tage in DMEM/15% FCS/2,500 µ/ml LIF ("Leukemia inhibiting factor", ESGRO, Life Technologies) mit Zusätzen (Iannaccone et al., Dev. Biol. 1994; 163: 288-292) in einem Medium von 6% CO<sub>2</sub>/Luft unbehandelt belassen. In dieser Zeit entwickeln sich die Blastozysten und binden sich an den Versorger, und die ICM beginnt zu wachsen, wobei die Effizienz vom genetischen Hintergrund abhängt. Auswüchse mit einer ES-zellenartigen Erscheinung werden aufgenommen und in mehrere Klumpen zerbrochen durch Ansaugen in gezogene Glaskapillaren mit einem etwas geringeren Durchmesser als die Auswüchse und auf frische Versorgerplatten aufgebracht. Das Aufnehmen und Zerbrechen erfolgt entweder täglich oder jeden zweiten Tag. Zerfallene Kolonien werden reihenweise zurückgesetzt, bis man eine kleine Zahl sauberer, stabil wachsender ES-artiger Klumpen erhält. Die Population der Klumpen wird dann auf mehrere Dutzend erweitert, in 35-mm-Schalen aufbewahrt und leicht trypsinisiert in ein Gemisch einzelner Zellen und kleiner Aggregate. Die hergestellten Ratten-ES-Zellen wurden jeden oder jeden zweiten Tag durch Trypsinierung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA-4Na, 1% Hühnerserum, in Ca/Mg-freier PBS) passagiert. Die Artenidentität der sich ergebenden Zelllinien wird durch PCR, unter Anwendung von Renin-Gen-Primern (Brenin et al., Transplant. Proc. 1997; 29: 1761-1765), geprüft, um eine Verunreinigung durch Maus-ES-Zellen auszuschließen.

##### 2. Intraportale Injektion von WKY abgeleiteten ECL in allogene Wirtsratten

[0019] Eine erste Reihe von Experimenten untersuchte das Schicksal einer einmaligen intraportalen Injektion von  $1,0 \times 10^6$  von WKY abgeleiteten ECL in allogene DA(RT1.<sup>av1</sup>)-Wirtsratten, die keinerlei immunsuppressive oder myeloablativ Behandlung erhalten haben. Die Untersuchungen zeigen, daß diese Zellen langfristig (> 150 Tage) in DA-Wirtsratten überleben können. Dabei wurde herausgefunden, daß die ECL und ihre Abkömmlinge einen Zustand eines ständig gemischten Chimärismus (Hämatopoetische Zellen des Spenders und des Empfängers bestehen nebeneinander im gleichen Wirt) erzeugen können. Weiterhin wurde herausgefunden, daß sich diese Zellen in hämatopoetische Zellen differenzieren, die MHC-Antigene der Klasse II (Ox-3) und B-Zellenabstammungsmarker (Ox-45) exprimieren. Der monoklonale Antikörper (mAb) Ox-3 ist ein spezifischer Antikörper eines (WKY)-MHC-Spenders der Klasse II, der sich an MHC-Epitope der Klasse II bindet, die an WKY exprimiert werden, jedoch nicht an positive DA MHC-Zellen der Klasse II. Eine fließzytometrische Bestimmung von doppelt gefärbten Leukozyten (WBC) ergab, daß 3 bis 5% der WBC, die DA-Ratten entnommen wurden (100 Tage nach der ECL-Injektion), Ox-3<sup>+</sup>-Zellen exprimierten, wobei 15-20% der Milzlymphozytenpopulation Ox-3<sup>+</sup> enthielten. Diese Ergebnisse weisen die Tatsache nach, daß ECL hämatopoetische Zellen erzeugen können. Dementsprechend wurden Ox-3<sup>+</sup>-Zellen histomorphologisch (10-15%) im interstitiellen Raum der Empfänger-(DA-)Herzen nachgewiesen, die selektiv 100 Tage nach einer einmaligen intraportalen Injektion von  $1,0 \times 10^6$  von WKY abgeleiteten ECL zerstört wurden (siehe Abb. 1).

[0020] Der stabile chimärische Zustand dieser Tiere schafft die Grundlage für die Untersuchung des Schicksals der WKY-Herzallotransplantats, die in DA-Ratten trans-

plantiert wurden, sieben Tage nach der intraportalen ECL-Injektion. Kaplan Meier Diagramme zeigen, daß die Vorbehandlung der DA-Ratten mit  $1,0 \times 10^6$  ECL intraportal und die Herztransplantation (HTx) sieben Tage später zu einer langfristigen ( $> 150$  Tage) abstoßungsfreien Allotransplantataktzeptanz führten, während nichtbehandelte DA-Ratten die WKY-Allografts akut abstießen (siehe Abb. 2). Gleichzeitig wurden die Herzallotransplantate von CAP-Ratten von mit WKY-ECL injizierten DA-Ratten innerhalb von  $12,4 \pm 1,4$  Tagen abgestoßen, was die Immunkompetenz dieser Ratten beweist.

### 3. Ko-Kultivierung von ECL mit somatischen Zelllinien

[0021] In primären in vitro Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die zuvor beschriebenen ECL-Zellen durch Ko-Kultivierung mit somatischen Zellen neuronalen oder entodermalen Ursprungs, eine Differenzierung in Astrozyten respektive Kardiomyozyten und Hepatozyten annehmen. Damit eignen sich die beschriebenen embryonalen Zelllinien auch zur Behandlung Organ-spezifischer Erkrankungen des Zentralnervensystems (z. B. als dopaminerge Zellen zur Behandlung des M. Parkinson, als Hepatozyten zur Behandlung der Leberzirrhose oder als Kardiomyozyten zur Behandlung frischer Herzinfarkte). Die nunmehr anstehende Isolierung der für diese spezifischen Differenzierungsformen notwendigen Signalproteine ist von großer klinischer Bedeutung, da sie ein problemloses Programmieren der ECLs zur gewünschten Zellpopulation ermöglichen konnte. Das Ziel besteht daher in der exakten Sequenzierung dieser Funktionsproteine, um deren rekombinante Herstellung zu ermöglichen. Die große Sequenzhomologie zwischen Ratten- und Menschprotein würde darüber hinaus auch Aufschlüsse zur analogen Herstellung menschlicher Funktionsproteine geben. Die damit verbundenen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten umfassen sowohl den voran beschriebenen Einsatz der ECL abgeleiteten somatischen Zelllinien als auch der daraus abgeleiteten Funktionsproteine für den zukünftigen klinischen Einsatz auf allen Indikationsebenen des Tissue-Engineering zum Organersatz, für Gentherapie und zur Behandlung metabolischer Erkrankungen im Bereich des ZNS, der Leber und des Herzens.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung einer spenderspezifischen Immuntoleranz gegen transplantierte Gewebe, dadurch gekennzeichnet, daß dem Empfänger vor der Transplantation Zellen verabreicht werden, die von frühen Embryonalstadien, z. B. Blastozysten, abgeleitet wurden ("embryonal stem cell like cell lines", ECL).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichten Zellen mit MHC-Genen und/oder Reportergen transfiziert wurden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen mit den spenderspezifischen MHC-Genen transfiziert wurden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch eine Fusion der ECL mit einer somatischen Zelle oder Zelllinie erfolgt, die die spenderspezifischen MHC-Gene aufweisen.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion mit einem bestimmten MHC-kodierenden Plasmid erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch Schaffung transgener nichtmenschlicher Säugetiere mit einem MHC-kodierenden Plasmid und die Herstellung von ECL von die-

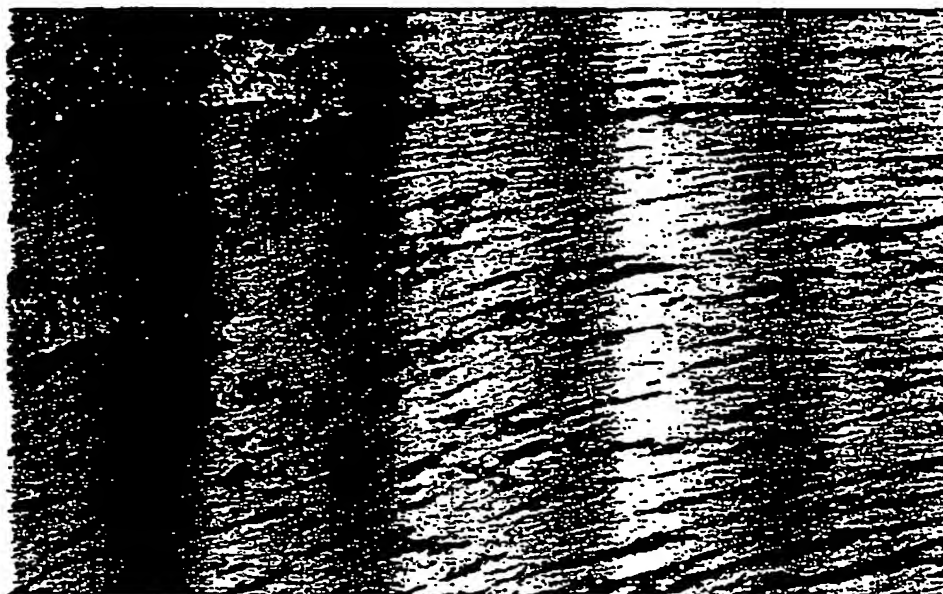
sen transgenen Tieren erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion durch Peptid-Beladung der ECL mit MHC-Allopeptiden der Klasse I, die für die hochpolymorphe  $\alpha_1$ -Helix eines spezifischen MHC-Antigens der Klasse I kodieren, erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichten Zellen mit einem LacZ-Plasmid transfiziert wurden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen von humanen Zelllinien eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen 3-7 Tage vor der Transplantation zugeführt werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen intravenös zugeführt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen intraportal zugeführt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen subkutan zugeführt werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen intraperitoneal zugeführt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ECL Zelllinie als Ausgangszelle zur Differenzierung in neuronale Zellen mit spezifischer Transmitterfunktion (z. B. Dopamin) programmiert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ECL Zelllinie als Ausgangszelle zur Differenzierung in Hepatozyten zur Unterstützung der leberspezifischen Metabolismen programmiert wird.
17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ECL Zelllinie als Ausgangszelle zur Differenzierung in Kardiomyozyten zur Regeneration der Herzmuskelfunktion programmiert wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die infolge der Ko-Kultivierung gefundenen Signalproteine mit spezifischem Differenzierungspotential für neuronale Zellen (dopamin-produzierende Zellen), Hepatozyten und Kardiomyozyten als rekombinante Proteine hergestellt werden.

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

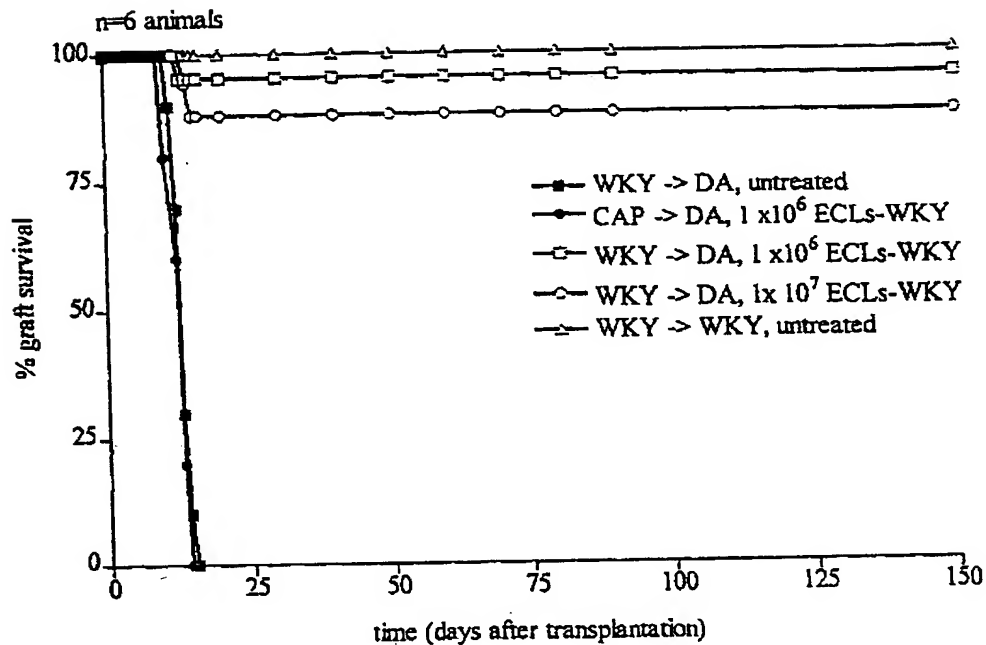
---



Ox-3<sup>+</sup> Zellen im DA-Empfänger-Herzen  
(APAAP-Färbung)

Abb. 1

*Überlebenskurven (nach Kaplan-Meier)  
nach heterotoper Herztransplantation im Rattenmodell*



Die heterotopie Herztransplantation wurde in folgenden Rattenstammkombinationen für folgende Versuchsanordnungen durchgeführt: (■) WKY → DA, unbehandelt; (●) CAP → DA, vorbehandelt mit  $1 \times 10^6$  WKY-Stammzellen am Tag -7 vor Herztransplantation von CAP- Herzen (Drittstammkontrolle); (□) WKY → DA, vorbehandelt mit  $1 \times 10^6$  WKY-Stammzellen am Tag -7 vor Herztransplantation von WKY- Herzen; (○) WKY → DA, vorbehandelt mit  $1 \times 10^7$  WKY-Stammzellen am Tag -7 vor Herztransplantation von WKY- Herzen; (△) WKY → WKY, unbehandelt, syngene Kontrollgruppe

Abb. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**